

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

3118072
H 06 R 7/02
2. Mai 1981
25. November 1982

① BUNDESREPUBLIK ② Offenlegungsschrift
DEUTSCHLAND ③ DE 3118072 A1



DEUTSCHES
PATENTAMT

- ④ Anmelder:
- Hausch, Claus-Christian, Dr. rer. nat., Dipl.-Ing., 8000
München, DE

P 3118072.0
7. 6. 81
25. 11. 82

⑤ H. o. S.
B01D 17/04
B 01 D 11/00
B 01 J 12/00

- ⑥ Anmeldungs-
- Anmeldung
- Offenlegung

- ⑦ Erfinder:
gleicher Anmelder
- ⑧ Rechtschreibschutz gem. § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG:
DE-AS 23 91 000
DE-AS 12 37 117
US 33 45 000
DE-Ges. Römer, Chemie-Lexikon, 7. Auflage, 1973,
Satz 1828 bis 1840;
U.S.-E. Journal of the American Oil Chemists Society Vol. 12,
1974, Seiten 22 bis 22.

BEST COPY AVAILABLE

⑨ Verfahren zur Trennung von dispeptischen Kolloiden aus wässrigen Zellulid-Lösungen zu präparativen Zwecken
und/oder zum Nachweis eines Analyten in wässriger Phase

Es wird ein Verfahren zur Entfernung kolloidalen Bestandteils aus wässrigen kolloidalen Lösungen beschrieben. Das Verfahren zeichnet sich dadurch vornehmlich aus, daß die physikochemischen und biologischen Eigenschaften, insbesondere auch der amorphen Kolloide in der wässrigen Lösung erhalten bleiben. Sie werden dadurch einem qualitativen und quantitativen biochemischen Nachweis oder einer weiteren Aufarbeitung zugänglich. Das Extraktionsverfahren beruht auf der Verwendung von Mischungen organischer Lösungsmittel mit einer wasserunlöslichen Komponente, die eine Oberflächenspannung < 25 dy/cm hat, und einer Komponente mit geringer Wasserlöslichkeit und einer Oberflächenspannung < 20 dy/cm. Der Anteil der wasserunlöslichen Komponente beträgt 50 bis 90 Vol-% der Lösungsmittelmischung. Konzentrationsverlust wird bei der Pflanzenöl/Flaschen-/Flüssigfettextraktion und im wässrigen Lösungen dispeptischer Kolloide auch in unverändertem Zustand der wässrigen Probe - im Gegensatz zu den bisher bekannten Extraktionsverfahren - keine Zersetzung ausgelöst, in der insbesondere kolloidalen Anteile, mit speziellen Eigenschaften präzisiert und detailliert analysiert sind.
(3118072)

DE 3118072 A1

DE 3118072 A1

1/84

DE 3118072 A1

3118072

23.11.81

Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung von fettlöslichen Stoffen aus wässrigen Kolloidlösungen, dadurch gekennzeichnet,
daß man einer lipophilen Substanzen enthaltenden Kolloid-
lösung eine Mischung aus einem wasserunlöslichen organi-
schen Lösungsmittel mit einer Oberflächenspannung < 25 dyn
pro cm und einem organischen Lösungsmittel mit geringer
Wasserlöslichkeit und/oder einer Oberflächenspannung
< 20 dyn/cm zufügt, die beiden Flüssigphasen miteinander
durch Schütteln durchmischt und anschließend von einander
trennt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
organische Lösungsmittelphase ein geringeres oder höheres
spezifisches Gewicht als die wässrige Phase hat.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als
wasserunlösliches organisches Lösungsmittel mit geringer
Oberflächenspannung ein Aliphat, ein aliphatischer Ether
oder Thioether mit 6 oder mehr Kohlenstoffatomen, ein Halo-
genkohlenstoff oder Halogenkohlenwasserstoff mit einer
Oberflächenspannung < 25 dyn/cm (gegen Dampf oder Luft) für
die Lösungsmittelmischung verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als
Lösungsmittelkomponente mit geringer Wasserlöslichkeit
und/oder geringer Oberflächenspannung 1 < 20 dyn/cm gegen
Dampf oder Luft ein Alkohol mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen,
ein primäres, sekundäres oder tertiäres Amin mit 4 bis 12
Kohlenstoffatomen, ein aliphatischer Monoalkyläther von
Athylenglykol mit 2 bis 12 Kohlenstoffatomen, ein Dialkyl-
äther von DiAthylenglykol mit 8 bis 16 Kohlenstoffatomen
oder Mischungen derselben verwendet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der
Volumenanteil der wasserunlöslichen Komponente 50 bis 90%
der organischen Lösungsmittelmischung beträgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Ver-
mischen einer wässrigen Kolloidlösung mit der organischen
Lösungsmittelmischung zwischen den Fütpunkten und den Siede-
punkten der Flüssigphasen erfolgt.

3118072

23.11.81

- 20 -

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei Kolloidlösungen biologischer Herkunft das Vermischen der wässrigen Lösung mit der organischen Lösungsmittel-
mischung bei einer Temperatur zwischen 4°C und 60,5°C,
5 günstigerweise zwischen 20°C und 41°C erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Durchmischung der Lösungen manuell oder automatisch erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach
Durchmischung die Phasentrennung der Lösungen nach einem
10. Verfahren erfolgt, das die unterschiedlichen spezifischen Dichten der Phasen berücksichtigt.
11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das
15. Abtrennen der Phasen manuell oder automatisch erfolgt.
12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
wässrige einen Analyt enthaltende Phase zu analytischen
oder präparativen Zwecken weiterverarbeitet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei
der Aufarbeitung von Flüssigkeiten biologischer Herkunft
ein chemischer, biologischer, biochemischer oder immunolo-
gischer Nachweis eines Analyts in der delipidierten wäss-
20. rigen Phase ausgeführt wird.

81

3118072

23.11.81

Verfahren zur Trennung von lipophilen Bestandteilen aus wässrigen Kolloid-Lösungen zu präparativen Zwecken und/oder zum Nachweis eines Analyts in wässriger Phase

- 5 Zahrlreiche Stoffe, die sich in organischen Lösungsmitteln lösen, die jedoch in wässrigem Medium unlöslich sind, können in Form einer Emulsion, d.h. in Gegenwart von niedermolekularen und/oder hochmolekularen Verbindungen mit amphiphilen Eigenschaften dennoch in der wässrigen Phase in Lösung gebracht werden. Insbesondere bei Naturstoffen, aber auch bei synthetischen Produkten können lipophile Stoffe (z.B. Neutralfette, fettlösliche Farbstoffe) die Weiterverarbeitung von hydrophilen Substanzen in der wässrigen Phase beeinträchtigen.
- 10 Sie müssen daher zum Zwecke der weiteren Aufarbeitung beseitigt werden. Verschiedene Verfahren sind entwickelt worden, die eine Extraktion von lipophilen Stoffen aus stabilen wässrigen, polymerhaltigen Lösungen ermöglichen (z.B. Extraktion mit Chloroform/Methanol bzw. Aethanol; 15 Isopropyläther/Butanol; Halogenkohlenwasserstoffen; Aether/Methanol bzw. Ethanol). Diese Verfahren erweisen sich jedoch für die Untersuchung und/oder Verarbeitung eines wasserlöslichen Polymers, das sich durch seine Eigenschaften als Detergent auszeichnet, als unzureichend, denn typische in der wässrigen Phase erhaltenen Merkmale des Analyts werden durch diese Behandlung beseitigt. In der Biochemie wird der Verlust dieser Merkmale als "Denaturierung" bezeichnet.
- 20 Häufig ist hingegen eine Beseitigung von störenden lipophilen Bestandteilen aus der wässrigen Kolloidlösung unter Erhaltung der physikalisch-chemischen und/oder biologischen Eigenschaften eines Analyts in der wässrigen Phase zum Zwecke der weiteren Aufarbeitung notwendig. In einzelnen Fällen hat sich eine Extraktion der Lipide in einem 25 Zweiphasensystem als geeignet erwiesen: z.B. Aether/Wasser;
- 30

3118072

23.11.81

- c. 4

- Halogenkohlenwasserstoffe bzw. Halogenkohlenstoffe/Wasser). Bei wässrigen Kolloidlösungen, die lipophile Bestandteile enthalten, ist jedoch bei diesen Verfahren eine ausreichende Durchmischung der Flüssigphasen nicht gewährleistet. Darüberhinaus bildet sich eine Zwischenphase, in der sich insbesondere ein Analyt mit Detergenteneigenschaften anreichert. Er wird dadurch dem wässrigen Medium für den Nachweis und/oder die weitere Verarbeitung entzogen. Ein Zusatz von neutralen Detergentien (z.B. Polyäthyleneoxydderivaten) oder anionischen Seifen kann die Anreicherung von Polymeren wie z.B. Proteinen in der Zwischenphase nicht verhindern.
- Überraschender Weise wurde festgestellt, daß eine Verarbeitung von wässrigen kolloidalen Lösungen, die lipophile Bestandteile in emulgiertter Form enthalten, mit einer Mischung eines wasserunlöslichen organischen Lösungsmittels mit geringer Oberflächenspannung (<25 dyn/cm gegen Dampf oder Luft) und einem niedermolekularen organischen Lösungsmittel mit nur geringer Wasserlöslichkeit, aber die Oberflächenspannung des Wassers stark herabsetzenden Eigenschaften eine Beseitigung der Lipotide aus der wässrigen Kolloidlösung in einem Ausmaß ermöglicht, das bei ausschließlicher Verwendung eines wasserunlöslichen organischen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches nicht erreicht werden kann. Darüberhinaus wurde festgestellt, daß unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches mit den angegebenen Eigenschaften keine Phase zwischen der wässrigen und der organischen Phase ausgebildet wird, in der ein gegebenenfalls zu untersuchender polymerer Analyt sich anreichert. Ferner ergab sich, daß die biologischen und/oder physikochemischen Eigenschaften eines zu untersuchenden Analyts in der wässrigen Phase erhalten bleiben und somit einem z.B. immunologischen oder biologischen Nachweis zugänglich sind, ohne daß ursprünglich in der wässrigen Kolloidlösung vorhandene lipophile Substanzen den Nachweis störend beeinflussen.

3118072

23.11.81

- 5 -

Im Vergleich zu den erwähnten herkömmlichen Methoden zeichnet sich das Verfahren dadurch vorteilhaft aus, daß es in Abrechnung der nur geringen Mengen der zu verwendenden Lösungsmittelgemische für eine Aufarbeitung von 5 Kolloidlösungen zeitersparend und weniger arbeitsintensiv ist, da sich für die weitere Aufarbeitung eines Analyts in der wässrigen Phase eine Beseitigung vom organischen Lösungsmittelbestandteilen erübrigt.

10 Folgende organische Lösungsmittel mögen als Vertreter ihrer Verbindungsgruppe aufgeführt sein:

I. Organische Lösungsmittel mit geringer Löslichkeit in wässrigem Medium und niedriger Oberflächenspannung

(< 20 dyn/cm)

15	$C_nH_{2n+m}-OH$	n:5-10;m:0 oder 1
	$C_nH_{2n+m}-NH_2$	n:4-13;m:0 oder 1
	$(C_nH_{2n+m})_2NH$	n:3-6 ;m:0 oder 1
	$(C_nH_{2n+m})_3N$	n:3-6 ;m:0 oder 1
20	$(C_nH_{2n+m}-O-CH_2CH_2)_2O$	n:3-6 ;m:0 oder 1
	$C_nH_{2n+2}-(O-CH_2CH_2)_2-OH$	n:3-6 ;m:0 oder 1
	$C_nH_{2n+2}-CO-C_mH_{2m+2}$	n:1-3 ;m:3-6

II. Wasserunlösliche organische Lösungsmittel mit niedriger Oberflächenspannung (< 25 dyn/cm)

25

Fluor-Chlorkohlenstoffe und Fluor-Chlorkohlenwasserstoffe
Aliphate
aliphatische Äther und Thioäther mit 6 der mehr Kohlenstoffatomen

30

3118072

22.11.81

6

Folgende Beispiele mögen den Vorteil des neu entwickelten Verfahrens verdeutlichen:

Beispiel :

- 5 Jeweils 0,5 ml Serum werden 10 Minuten mit 1 ml des organischen Lösungsmittels a bzw. der Lösungsmittelmischungen b bis e geschüttelt. Anschließend wird zentrifugiert und aus der wässrigen Phase die Lipidkonzentration gemessen.
 10 Die Ergebnisse zeigen, daß bei alleiniger Verwendung des Fluor-Chlorkohlenstoffpolymer als organisches Lösungsmittel eine unzureichende Lipidextraktion erreicht wird. Bei der Verwendung der angegebenen Lösungsmittelgemische (in Vol. Teilen) wird hingegen eine Extraktion von Triglycerid bzw. Cholesterin bis zu 98%, für Phospholipid bis zu 85%
 15 erreicht
 a. Fluor-Chlorkohlenstoffpolymer (Frigen 113 Polymer)
 b. Cyclohexanol/Frigen 113 Polymer (25/75)
 c. n-Hexanol /Frigen 113 Polymer (25/75)
 d. 1-Heptanol/Frigen 113 Polymer (25/75)
 20 e. 2-Heptanol/Frigen 113 Polymer (25/75)

	Triglycerid (mg/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Phospholi- pid (mg/dl)
Serum nativ	1670	510	350
" n. Extraktion a	510	254	164
" " b. Extraktion b	34	-	98
" " c. c.	34	10	55
" " d.	30	13	65
" " e.	34	13	84

3118072

23.11.66

- 7 -

Beispiel 2
 Extraktion von Lipiden in wässriger Kolloidlösung
 mit anderen als in Beispiel 1 angegebenen Lösungsmittel-
 teilmischungen. 0,5 ml Serum wird mit 0,7 ml eines
 organischen Lösungsmittels bzw. einer Lösungsmittel-
 mischung in der gleichen Weise behandelt, wie in Beispiel 1 be-
 schrieben. Die Ergebnisse zeigen den wesentlich höheren
 Effekt der angegebenen Lösungsmittelgemische bei der
 Lipidextraktion gegenüber den reinen wasserunlöslichen
 Lösungsmitteln. Die in Klammern angegebenen Quotienten
 kennzeichnen das Mischungsverhältnis der Volumina der
 einzelnen Lösungsmittelpkomponenten.

		Triglycerid (mg/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Phosphatid (mg/dl)
15	Serum nativ	653	190	331
	Serum + CF ₃ CCl ₂ *	151	101	80
	Serum + Frigen 113 Pol. *107	64	109	
	Serum + CF ₃ CCl ₂ /			
	n-Hexylamin(95/5) 12	16	21	
20	" + CF ₃ CCl ₂ /Diethyl- englycoldimonoxybutyl- ether(80/20) 17	17	17	29
"	+ CF ₃ CCl ₂ /			
	n-Hexanol(75/25)* 33	24	41	
25	" + CF ₃ CCl ₂ /Diethyl- englycoldiethyl- ether(95/5) 92	87	138	
"	+ Frigen 113 Polym./			
	n-Hexylamin(95/5) 17	13	20	
"	+ Frigen 113 Polym./			
	Diethylenglycoldi- noxybutylether(80/20) 6	15	51	
"	+ Frigen 113 Polym./			
	n-Hexanol (75/25) 31	20	80	
35	" + Frigen 113 Polym./			
	Diethylenglycoldi- ethylether(80/20) 82	55	81	

*geringfügige Kieselpräzipitation in der Zentrenphase

3118072

Beispiel 3

Extraktion von Lipiden in Flüssigphase mit Hilfe weiterer Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische. Das Mischungsverhältnis beträgt 0,5 ml Serum und 0,7 ml organisches Lösungsmittel. Die in Klammern angegebenen Quotienten kennzeichnen das Mischungsverhältnis der Volumina der organischen Lösungsmittelkomponenten. Die Tabelle veranschaulicht den deutlich wirksameren Effekt der Lipidextraktion bei der Verwendung der angegebenen Lösungsmittelgemische.

	Triglycerid (mg/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
Serum nativ	171	183	88
15 Serum + n-Hexan *	170	180	84
Serum + Ullisopropyläther*	122	161	51
Serum + n-Hexan/n-Octylamin (95/5)	3	1*	0
20 Serum + Ullisopropyläther/ n-Octylamin (95/5)	8	11	0
Serum + n-Hexan/Diäthylengly- kolmonohutyläther (90/10)	0	11	12
25 Serum + Ullisopropyläther/Di- äthylemmunobutyläther (90/10)	0	0	0
Serum + CF ₃ CCl ₂ /n-Octylamin (95/5)	0	11	10
30 Serum + CF ₃ CCl ₂ /n-Octylamin	34	36	18

* geringfügige Eiweißpräzipitation in der Zwischen-Phase

3118072

-x.9

Beispiel 4

Nachweis der Erhaltung der immunchemischen Eigenschaften eines komplexgebundenen antigenen Kopolymeren nach einer Delipidierung in Flüssigphase.

- 5 0,1 ml einer Lösung eines aus menschlichem Serum isolierten Lipoproteins (High Density Lipoprotein, HDL) wurden mit 0,3ml eines organischen Lösungsmittels nach Beispiel 1, Extraktionsverfahren a bzw. b 10 min im Schüttelautomaten geschüttelt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation in einer Laborzentrifuge getrennt. 20 µl der wässrigen Phase wurden mit 2ml 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden mit einem Antiserum gegen Apolipoprotein AI, einem Proteinstandteil der HDL, gemischt. Die Lichtstreuung der sich bildenden Immunkomplexe mit Apolipoprotein AI wurde über einen Zeitraum von 2 Std. mit Hilfe eines Laser-Nephelometers gemessen.
- Die Messung ergab, daß die Reaktion mit nativer HDL, in der der antigenen Analyt mit Lipid assoziiert ist, wesentlich langsamer verläuft als nach einer Delipidierung nach dem Extraktionsverfahren a. Die Vorbehandlung der Probe nach dem Extraktionsverfahren b führte zum gleichen Ergebnis im immunchemischen Nachweis wie im Falle der unbehandelten Probe. Während nach der Lipidentfernung nach Verfahren b das Maximum des Immunnephelometrischen Signals nach 90 min erreicht ist, ist die Immunreaktion nach Extraktion nach dem Verfahren a noch 2 Std. noch nicht beendet.

© BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

② Anmelder:
Hoechst AG, 6000 Frankfurt

© Dokument-Zettel-Ausgabe
Wasserzeichen-Daten
magnetische Form (1)

In welcher M für ein
anderes Modell wird, R
Ethyl-, Methoxy-, Ethoxy-
gruppe, H und R, eine
oder eine Methoxy-, Ethoxy-
Wasserzeichen-Daten
oder Butylgruppe oder
Vinylgruppe, die β -Butyl-
Oxygruppen-Gruppe und
-CO-H in Wasserzeichen
magnetische Form (1) auf
die untenstehenden Angaben
zu und für eine diese
Vervielfältigung der abgedruckten

DE 3118072 A1